

(12) NACH DEM VERTRAG FÜR DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT IM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. März 2004 (11.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/020659 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

Herzogenaurach (DE). STANZEL, Manfred [DE/DE];
Taanusstr. 100, 91056 Erlangen (DE). ZEININGER,
Heinrich [DE/DE]; Tannenstr. 6, 90587 Obermichelbach
(DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/002483

(22) Internationales Anmeldedatum:

23. Juli 2003 (23.07.2003)

(74) Gemeinsamer Vertreter: SIEMENS AKTIENGE-
SELLSCHAFT; Postfach 22 16 34, 80506 München
(DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (national): CN, JP, US.

(30) Angaben zur Priorität:
102 36 459.1 8. August 2002 (08.08.2002) DE

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];
Wittelsbacherplatz 2, 80333 München (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FEUCHT, Hans-Di-
eter [DE/DE]; Eschenweg 7, 71272 Renningen (DE).
GUMBRECHT, Walter [DE/DE]; In der Röte 1, 91074

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: RECOGNITION LAYERS MADE OF HYDROGEL BASED ON POLYACRYLAMIDE FOR USE IN BIOSENSOR TECHNOLOGY

(54) Bezeichnung: ERKENNUNGSSCHICHTEN AUS HYDROGEL AUF DER BASIS VON POLYACRYLAMID FÜR DIE BI-
OSENSORIK

(57) Abstract: The invention relates to a hydrophilic immobilization layer for biosensors made of a radically cross-linkable hydrogel based on polyacrylamide, whereby the starting composition comprises acrylamide, cross-linkers, radical initiator(s), at least one comonomer having reactive linker groups and optionally comprises softeners or the inventive layer is made of a photostructured hydrogel based on polyacrylamide, whereby the starting composition comprises acrylamide, cross-linkers, photoinitiators, at least one film former, at least one comonomer having reactive linker groups and optionally comprises softeners.

(57) Zusammenfassung: Hydrophile Immobilisierungsschicht für Biosensoren aus einem radikalisch vernetzbaren Hydrogel auf Basis von Polyacrylamid, wobei die Ausgangszusammensetzung Acrylamid, Vernetzungsmittel, Radikalinitiator(en), wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls Weichmacher umfasst, oder aus einem fotostrukturierten Hydrogel auf Basis von Polyacrylamid, wobei die Ausgangszusammensetzung Acrylamid, Vernetzungsmittel, Fotoinitiatoren, wenigstens einen Filmbildner, wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls Weichmacher umfasst.

WO 2004/020659 A1

Beschreibung

ERKENNUNGSSCHICHTEN AUS HYDROGEL AUF DER BASIS VON POLYACRYLAMID FÜR DIE
BIOSENSORIK

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft eine Immobilisierungsschicht für Biosensoren sowie ihre Verwendung zur Erzeugung von biosensorischen Erkennungsschichten, insbesondere zur Erzeugung von sogenannten DNA-Chips.
- 10 In der modernen biologischen Analysentechnik, aber auch in der medizinischen Diagnostik, werden in zunehmendem Maße Biosensoren eingesetzt, bei denen ein biologisches Erkennungssystem mit einem physikalischen Transducer verknüpft ist. Unter Erkennungssystemen versteht man biologische Erkennungsmoleküle, wie Antikörper, Enzyme, Nucleinsäuren und dergleichen, welche über eine sogenannte Immobilisierungsschicht an einem Träger (Transducer) gebunden sind. Als Transducer werden hauptsächlich kalorimetrische, piezoelektrische, optische und elektrochemische Prinzipien verwendet.
- 20 Die Erkennungssysteme, respektive ursprünglich die Immobilisierungsschichten, werden dabei meist in annähernd zweidimensionalen Schichten auf den Transducersystemen immobilisiert. Die Immobilisierung der Erkennungsmoleküle kann durch
- 25 kovalente Bindungen, durch Affinitätswechselwirkung aber auch durch hydrophil/hydrophobe Wechselwirkungen erfolgen. Aus Stabilitätsgründen werden kovalente Bindungen bevorzugt, jedoch kommt auch die Bildung stabiler Komplexe, wie zum Beispiel Biotin/Avidin, erfolgreich zum Einsatz. Einen guten
- 30 Überblick über den Aufbau annähernd zwei-dimensionaler biologischer Erkennungsschichten geben I. Willner, E. Katz: "Redoxproteinschichten auf leitenden Trägern - Systeme für bioelektronische Anwendungen" in Angew. Chem. 2000, 112, S. 1230-69.
- 35 Bei Transducer-Oberflächen, welche NH- oder OH-Gruppen enthalten, werden die biologischen Funktionsträger, d.h. die Erkennungsmoleküle, häufig durch Alkoxysilane, welche sogenann-

te Linkergruppen enthalten, aber auch mit Hilfe von Cyanurchlorid oder Carbodiimid immobilisiert. Zur Ausrüstung goldhaltiger Transduceroberflächen werden mit Thiolalkyl gelabelte Erkennungsmoleküle eingesetzt, die über Schwefel-Gold-

5 Bindungen in Form von sogenannten Self-Assembly-Schichten auf der Transduceroberfläche immobilisiert werden. Ein interessanter Ansatz zur Immobilisierung von Nucleinsäuren auf Transduceroberflächen ist die photochemisch unterstützte Synthese von Affymetrix (Light-directed spatially addressable
10 parallel chemical synthesis, S.P.A. Fodor et al., Science 251, 767-773 (1991)).

Zur Steigerung der Empfindlichkeit von Biosensoren sowie zur Optimierung der Reproduzierbarkeit der damit erhaltenen Mess-
15 ergebnisse ist der Einsatz dreidimensionaler Immobilisierungsschichten für die biologischen Erkennungsmoleküle sinnvoll. Die Firma Schleicher & Schüll GmbH bietet unter dem Namen FASTTM Slides DNA-Chips an, in welchen die Fänger-Oligos in einer drei-dimensionalen Nitrocellulose-Membran immobilisiert sind (BioMolecular Screening, Catalog 2001, intern.
20 Edit. Fa. Schleicher & Schüll).

In der WO 00/43539 ist der Aufbau einer dreidimensionalen DNA-Erkennungsschicht durch Immobilisierung der DNA-Fänger-
25 Sonden in Form von Polymer-Brushes beschrieben.

Von Timofeev et al. wird ein chemisch modifiziertes, radikalisch vernetztes Polyacrylamid beschrieben, das zum Beispiel für die Immobilisierung von Fänger-Oligos eingesetzt werden
30 kann (E. N. Timofeev et al., Regioselective Immobilization of Short Oligonucleotides to Acrylic Copolymer Gels, Nucleic Acids Research, 1966, Vol.24, No. 16, 3142-3148). Hier werden als Kopplungsgruppen im Hydrogel Amino- oder Aldehydgruppen verwendet. Aldehyd- bzw. Amino-funktionalisierte Fänger-
35 Oligos können an diese Kopplungsgruppen unter reduktiven Reaktionsbedingungen kovalent immobilisiert werden. Das bedeutet aber, dass neben der eigentlichen Kopplungsreaktion zwi-

schen Amino- und Aldehydgruppe, bzw. umgekehrt, ein zusätzlicher Reduktionsschritt unter Einsatz von Reduktionsmitteln erforderlich ist. Weitere von Timofeev et al. beschriebene Methoden zur chemischen Aktivierung des vernetzten Polyacrylamids erfordern ebenfalls zusätzliche Reaktionsschritte in der Polymermatrix.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Erzeugung einer hydrophilen Immobilisierungsschicht für biosensorische Anwendungen auf Basis eines Hydrogels sowie die Verwendung solcher Immobilisierungsschichten zur Erzeugung von Erkennungsschichten durch kovalente Einkopplung biologischer Erkennungsmoleküle.

Die vorliegende Erfindung löst diese Aufgabe unter Verwendung von radikalisch vernetzten oder fotostrukturierten Hydrogelen als Immobilisierungsschicht. Solche Hydrogele sind in den deutschen Patentanmeldungen "Radikalisch vernetzbare Zusammensetzung zur Erzeugung einer Hydrogelschicht" bzw. "Fotostrukturierbare Zusammensetzung zur Erzeugung einer Hydrogelschicht" (Aktenzeichen noch nicht bekannt) der Anmelderin beschrieben.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demnach einmal eine hydrophile Immobilisierungsschicht für Biosensoren aus einem radikalisch vernetzten Hydrogel auf Basis von Polyacrylamid, wobei die Ausgangszusammensetzung Acrylamid, Vernetzungsmittel, Radikalinitiatoren, wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls Weichmacher sowie sonstige Additive umfasst.

Gegenstand der vorliegenden Verbindung ist auch eine hydrophile Immobilisierungsschicht aus einem fotostrukturierten Hydrogel auf Basis von Polyacrylamid, wobei die Ausgangszusammensetzung Acrylamid, Vernetzungsmittel, Fotoinitiatoren, wenigstens einen Filmbildner, wenigstens ein Comonomer

mit reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls Weichmacher sowie andere Additive umfasst.

Die erfindungsgemäßen Systeme erlauben den Aufbau von Sensor-arrays mit biologischen Erkennungsmolekülen in einer dreidimensionalen Matrix in hoher Integrationsdichte.

Bevorzugte Ausführungsformen bzw. Zusammensetzungen der erfindungsgemäßen hydrophilen Immobilisierungsschichten ergeben sich aus den Unteransprüchen 3 bis 10.

Den Zusammensetzungen können gegebenenfalls weitere Komponenten beigefügt werden, welche die Mischbarkeit der beteiligten Monomere und der Initiatoren gewährleisten. Zur Herabsetzung der Oberflächenspannung können handelsübliche Additive verwendet werden.

Nach Schichtherstellung auf einem Transducersystem und thermischer bzw. Fotovernetzung oder Fotopolymerisation oder Fotostrukturierung bzw. Polymerisationsstrukturierung wird ein mit Wasser quellbares Hydrogel erhalten, in das unter Verwendung der Linkergruppen biologische oder chemische Erkennungsmoleküle für analytische oder diagnostische Anwendungen unter Erhalt ihrer Funktionsfähigkeit eingekoppelt werden können.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demzufolge auch die Verwendung der Immobilisierungsschichten zur Herstellung von biosensorischen Erkennungsschichten durch (kovalentes) Einkuppeln bzw. Immobilisieren von chemischen oder biologischen Erkennungsmolekülen, wobei die Erkennungsmoleküle vorzugsweise Fänger-Oligonukleotide sind.

Grundsätzlich kann die Ausgangszusammensetzung zur Erzeugung der Hydrogelschicht (Immobilisierungsschicht) mit allen modernen Beschichtungstechnologien auf die geeigneten Träger aufgebracht werden. Bevorzugt werden jedoch Spin-Coating sowie Dispensieren angewendet.

Die Eigenschaften der zu erzeugenden Hydrogelschicht bezüglich Hydrophile, Vernetzungsdichte, Quellbarkeit, etc. lassen sich in weiten Bereichen durch die Art der verwendeten Ausgangskomponenten, deren Verhältnis zueinander und letztendlich der Art der Schichtbildung variieren.

Die Hydrogelmatrix kann an die zum Einsatz kommenden biologischen Erkennungsmoleküle, insbesondere im Hinblick auf die Vernetzungsdichte, angepasst werden. Die Vernetzungsdichte wird durch Art und Konzentration der verwendeten Vernetzermoleküle, wie Acryl- und/oder Methacrylverbindungen, insbesondere Methylenbis(meth)acrylamid und/oder Dimethacrylsäureester, wie Tetraethylenglycoldimethacrylat, gesteuert werden.

Die Hydrogelmischung kann auch an das für den speziellen Anwendungszweck bevorzugte Beschichtungsverfahren angepasst werden.

Für Spin-Coating kommt zum Einen die Verwendung eines polymeren Filmbildners, wie Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylamid und/oder Polyhydroxymethacrylat, in Frage. Zum anderen können hochsiedende Lösungsmittel, wie z. B. Ethylenglykol, für die Hydrogelmischung verwendet werden, die beim Spin-Coating nicht vollständig verdampfen und so als Weichmacher in der Schicht verbleiben. Der Restlösemittelgehalt kann dann durch einen Prebake-Schritt vor der Vernetzung gezielt weiter reduziert und somit u.a. die Polymerisationsausbeute bzw. die resultierende Schichtdicke gesteuert werden. Gegebenenfalls können zusätzliche Weichmachersysteme, wie Di- und/oder Triethylenglykol, zugesetzt werden.

Bei der Schichtbildung durch Dispensieren wird die Hydrogelmischung in Lösung je nach Transducerdimensionen in Tropfen in einer Größe von einigen Mikrolitern bis zu einem Nanoliter aufgebracht. Für das Dispensieren werden hochsiedenden Lösemittel, die eine ausreichend lange Lebensdauer des Tropfens

an der Spitze der Dispensierkanüle aufweisen, verwendet. Damit wird das Dosieren und Absetzen des Tropfens reproduzierbar. Andererseits darf der Siedepunkt des Lösungsmittels nicht zu hoch sein, um ein ausreichend rasches Abdampfen des Lösungsmittels aus dem abgesetzten Tropfen zu ermöglichen. Gegebenenfalls ist hier ein Tempersschritt zur Steuerung des Gehalts an Restlösemittel erforderlich. Erfindungsgemäß kommen für das Dispensieren der Hydrogelmischung bevorzugt Dimethylformamid und/oder Ethylenglykol zum Einsatz.

Die Hydrogelmischung kann in Schicht- oder Spotform auf Transducer- oder Trägeroberflächen aus Metall, Glas, Silicium, Siliciumdioxid, Siliciumnitrid oder Kunststoff aufgebracht werden. Es können auch Oberflächen mit Topographie, die aus unterschiedlichen Materialien bestehen, wie z. B. Interdigitalelektrodenarrays auf Siliciumnitrid als Passivierung, beschichtet werden. Die Beschichtung von Flächen schließt auch die Beschichtung innerer Oberflächen von Mikrokanälen oder Nanotubes ein. Die zu beschichtenden Oberflächen sind gegebenenfalls mit einem Haftvermittler beschichtet.

Die Polymerisation und Vernetzung der Hydrogelschicht erfolgt durch thermische oder UV-Initiierung. Bei UV-Initiierung kann auch eine Strukturierung der Hydrogelschicht durch Kontakt- bzw. Proximitybelichtung durch eine Maske erfolgen. Die Hydrogelschicht arbeitet hier wie ein Negativ-Resist. Im bestrahlten Bereich wird polymerisiert und vernetzt. In den abgedunkelten Bereichen findet keine Reaktion statt. Die hier befindliche Hydrogelmischung wird in einem Entwicklungsschritt wieder vom Substrat abgelöst. Hilfskomponenten wie polymere Filmbildner oder Weichmacher können durch Extraktion aus der vernetzten Hydrogelschicht entfernt werden. Dieser Schritt kann unter Umständen zeitgleich mit dem eigentlichen Ausrüstungsschritt erfolgen.

Die bioglogischen oder chemischen Erkennungssysteme werden vorzugsweise aus wässriger Lösung, aus wässriger Pufferlösung

oder aus Gemischen polarer Lösungsmittel mit Wasser auf die Immobilisierungsschicht aufgebracht. Das Aufbringen erfolgt durch Auftropfen oder Aufspotten/Aufdispensieren. In Nanotubes oder Mikrokanäle kann das Heranbringen der Lösung mit den biologischen oder chemischen Erkennungsmolekülen an die vernetzte Hydrogelschicht auch durch den Transport durch das fluidische System selbst erfolgen. Für die zielgenaue Beladung von Messspots werden vorteilhafterweise vernetzte Hydrogelspots verwendet, die von einem Schutzring umgeben sind.

Für das kovalente Ankoppeln der biologischen oder chemischen Erkennungsmoleküle, die mit einer zur im vernetzten Hydrogel vorhandenen Linkergruppe passenden Kopplungsgruppe versehen sind, kann je nach Reaktivität ein Tempersschritt erforderlich sein. Um das Austrocknen der Hydrogelschicht während der Kopplungsreaktion zu verhindern, kann in einer Klimakammer gearbeitet werden. Besonders geeignet für die Ankopplung an die Linkergruppen Epoxyd und Maleinsäureanhydrid sind Aminoalkylgruppen.

Patentansprüche

- 1.. Hydrophile Immobilisierungsschicht für Biosensoren aus
einem radikalisch vernetzten Hydrogel auf Basis von Po-
lyacrylamid, wobei die Ausgangszusammensetzung Acryla-
mid, Vernetzungsmittel, Radikalinitiator(en), wenigstens
ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und gegebenen-
falls Weichmacher umfasst.
2. Hydrophile Immobilisierungsschicht aus einem foto-
strukturierten Hydrogel auf Basis von Polyacrylamid, wo-
bei die Ausgangszusammensetzung Acrylamid, Vernetzungs-
mittel, Fotoinitiator(en), wenigstens einen Filmbildner,
wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und
gegebenenfalls Weichmacher umfasst.
3. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach Anspruch 1 oder
2, dadurch gekennzeichnet, dass das Vernet-
zungsmittel eine Acryl- und/oder Methacrylverbindung
ist.
4. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet, dass das Vernetzungs-
mittel Methylenbis(meth)acrylamid und/oder Dimethacryl-
säureester ist.
5. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach einem der An-
sprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass
das Comonomer mit reaktiven Linkergruppen Maleinsäurean-
hydrid und/oder Glycidyl(meth)acrylat ist.
6. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach einem der An-
sprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass
der Weichmacher Mono-, Di- und/oder Triethylenglycol
ist.

7. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausgangszusammensetzung, in einem polaren, mit Wasser mischbaren Lösungsmittel vorliegt.

5

8. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Lösungsmittel Dimethylformamid ist.

- 10 9. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach einem der Ansprüche 2 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Filmbildner Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylamid und/oder Polyhydroxymethacrylat ist.

- 15 10. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf Transducer- oder Trägeroberflächen aus Metall, Glas, Silicium, Siliciumdioxid, Siliciumnitrid, Kunststoff oder auf Oberflächen mit Topographie erzeugt ist.

20

11. Verwendung der Immobilisierungsschicht nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung von biosensorischen Erkennungsschichten durch (kovalentes) Einkuppeln bzw. Immobilisieren von chemischen oder biologischen Erkennungsmolekülen.

25

12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkennungsmoleküle Fänger-Oligonukleotide sind.

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/0483

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q C08F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 31148 A (BEUHLER ALLYSON J ; MCGOWEN JOHN A (US); MOTOROLA INC (US)) 2 June 2000 (2000-06-02) abstract page 3, line 24 -page 4, line 7 page 5, line 1 -page 19, line 25 claims 1-26	1-11
X	WO 00 43539 A (BIOCHIP TECHNOLOGIES GMBH ; RUEHE JUERGEN (DE); PRUCKER OSWALD (DE)) 27 July 2000 (2000-07-27) cited in the application abstract	1-11

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 November 2003

Date of mailing of the international search report

28/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Madlener, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/483

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 596 038 A (SUBRAMANIAM RAJ) 21 January 1997 (1997-01-21) abstract column 5, line 42 -column 6, line 27 examples 1-12 claims 1-12 ---	1-11
A	US 5 428 076 A (ROE DONALD C) 27 June 1995 (1995-06-27) the whole document ---	1-11
A	US 5 972 375 A (TRUTER PATRICIA-ANN ET AL) 26 October 1999 (1999-10-26) the whole document ---	1-11
A	VASILISKOV A V ET AL: "FABRICATION OF MICROARRAY OF GEL-IMMOBILIZED COMPOUNDS ON A CHIP BY COPOLYMERIZATION" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US, vol. 27, no. 3, September 1999 (1999-09), pages 592,594,596-598,600,602,604,606, XP000849476 ISSN: 0736-6205 the whole document ---	1-11
A	HEALEY B G ET AL: "FIBEROPTIC DNA SENSOR ARRAY CAPABLE OF DETECTING POINT MUTATIONS" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 251, no. 2, 5 September 1997 (1997-09-05), pages 270-279, XP000703841 ISSN: 0003-2697 the whole document ---	1-11
A	TIMOFEEV E ET AL: "Binding specificity and stability of duplexes formed by modified oligonucleotides with a 4096-hexanucleotide microarray" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 29, no. 12, June 2001 (2001-06), pages 2626-2634, XP002961131 ISSN: 0305-1048 the whole document -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 02/0483

Patent document cited in search report	Classification date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0031148	A	02-06-2000	US 2002035167 A1 21-03-2002 AU 2028500 A 13-06-2000 WO 0031148 A2 02-06-2000 US 2002115740 A1 22-08-2002
WO 0043539	A	27-07-2000	EP 1035218 A1 13-09-2000 AU 3150400 A 07-08-2000 CA 2360027 A1 27-07-2000 WO 0043539 A2 27-07-2000 EP 1144677 A2 17-10-2001 JP 2002535450 T 22-10-2002
US 5596038	A	21-01-1997	AU 2547795 A 05-12-1995 CA 2189866 A1 23-11-1995 EP 0759945 A1 05-03-1997 WO 9531491 A1 23-11-1995 US 5817016 A 06-10-1998
US 5428076	A	27-06-1995	US 5372766 A 13-12-1994 AT 197675 T 15-12-2000 AU 680558 B2 31-07-1997 AU 7925494 A 23-10-1995 CA 2185546 A1 12-10-1995 DE 69426335 D1 28-12-2000 DE 69426335 T2 23-05-2001 EP 0752891 A1 15-01-1997 ES 2151934 T3 16-01-2001 JP 3414744 B2 09-06-2003 JP 9511536 T 18-11-1997 WO 9526758 A1 12-10-1995 ZA 9407604 A 16-05-1995
US 5972375	A	26-10-1999	AT 155493 T 15-08-1997 AU 664913 B2 07-12-1995 AU 4459993 A 24-02-1994 CA 2103846 A1 14-02-1994 DE 69312181 D1 21-08-1997 DE 69312181 T2 11-12-1997 EP 0583170 A1 16-02-1994 IL 106660 A 15-04-1997 JP 6212045 A 02-08-1994 ZW 9693 A1 01-12-1993 ZA 9305878 A 12-04-1994

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q C08F

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00 31148 A (BEUHLER ALLYSON J ;MCGOWEN JOHN A (US); MOTOROLA INC (US)) 2. Juni 2000 (2000-06-02) Zusammenfassung Seite 3, Zeile 24 -Seite 4, Zeile 7 Seite 5, Zeile 1 -Seite 19, Zeile 25 Ansprüche 1-26 ---	1-11
X	WO 00 43539 A (BIOCHIP TECHNOLOGIES GMBH ;RUEHE JUERGEN (DE); PRUCKER OSWALD (DE)) 27. Juli 2000 (2000-07-27) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung --- -/-	1-11

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. November 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

28/11/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Madlener, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE LITERATUR

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 596 038 A (SUBRAMANIAM RAJ) 21. Januar 1997 (1997-01-21) Zusammenfassung Spalte 5, Zeile 42 -Spalte 6, Zeile 27 Beispiele 1-12 Ansprüche 1-12	1-11
A	US 5 428 076 A (ROE DONALD C) 27. Juni 1995 (1995-06-27) das ganze Dokument	1-11
A	US 5 972 375 A (TRUTER PATRICIA-ANN ET AL) 26. Oktober 1999 (1999-10-26) das ganze Dokument	1-11
A	VASILISKOV A V ET AL: "FABRICATION OF MICROARRAY OF GEL-IMMOBILIZED COMPOUNDS ON A CHIP BYCOPOLYMERIZATION" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US, Bd. 27, Nr. 3, September 1999 (1999-09), Seiten 592,594,596-598,600,602,604,606, XP000849476 ISSN: 0736-6205 das ganze Dokument	1-11
A	HEALEY B G ET AL: "FIBEROPTIC DNA SENSOR ARRAY CAPABLE OF DETECTING POINT MUTATIONS" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, Bd. 251, Nr. 2, 5. September 1997 (1997-09-05), Seiten 270-279, XP000703841 ISSN: 0003-2697 das ganze Dokument	1-11
A	TIMOFEEV E ET AL: "Binding specificity and stability of duplexes formed by modified oligonucleotides with a 4096-hexanucleotide microarray". NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 29, Nr. 12, Juni 2001 (2001-06), Seiten 2626-2634, XP002961131 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument	1-11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/2483

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Nummer der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0031148	A	02-06-2000	US 2002035167 A1 21-03-2002
		AU 2028500 A 13-06-2000	
		WO 0031148 A2 02-06-2000	
		US 2002115740 A1 22-08-2002	
WO 0043539	A	27-07-2000	EP 1035218 A1 13-09-2000
		AU 3150400 A 07-08-2000	
		CA 2360027 A1 27-07-2000	
		WO 0043539 A2 27-07-2000	
		EP 1144677 A2 17-10-2001	
		JP 2002535450 T 22-10-2002	
US 5596038	A	21-01-1997	AU 2547795 A 05-12-1995
		CA 2189866 A1 23-11-1995	
		EP 0759945 A1 05-03-1997	
		WO 9531491 A1 23-11-1995	
		US 5817016 A 06-10-1998	
US 5428076	A	27-06-1995	US 5372766 A 13-12-1994
		AT 197675 T 15-12-2000	
		AU 680558 B2 31-07-1997	
		AU 7925494 A 23-10-1995	
		CA 2185546 A1 12-10-1995	
		DE 69426335 D1 28-12-2000	
		DE 69426335 T2 23-05-2001	
		EP 0752891 A1 15-01-1997	
		ES 2151934 T3 16-01-2001	
		JP 3414744 B2 09-06-2003	
		JP 9511536 T 18-11-1997	
		WO 9526758 A1 12-10-1995	
		ZA 9407604 A 16-05-1995	
US 5972375	A	26-10-1999	AT 155493 T 15-08-1997
		AU 664913 B2 07-12-1995	
		AU 4459993 A 24-02-1994	
		CA 2103846 A1 14-02-1994	
		DE 69312181 D1 21-08-1997	
		DE 69312181 T2 11-12-1997	
		EP 0583170 A1 16-02-1994	
		IL 106660 A 15-04-1997	
		JP 6212045 A 02-08-1994	
		ZW 9693 A1 01-12-1993	
		ZA 9305878 A 12-04-1994	